

アスタリールオイル50F

アスタキサンチン定量試験法

アスタリールオイル50Fはヘマトコッカス藻(*Haematococcus pluvialis*)から抽出したアスタキサンチンをフリー体換算値で5.0%含有するヘマトコッカス藻色素製剤である。

ヘマトコッカス藻の主成分はアスタキサンチンであり、アスタキサンチンは脂肪酸エステル体及びフリー体の形で含まれる。脂肪酸エステル体のアスタキサンチンをコレステロールエステラーゼにより脱エステル化を行い、フリー体(trans体, 13-cis体, 9-cis体)となったアスタキサンチンを逆相クロマトグラフにより定量する。

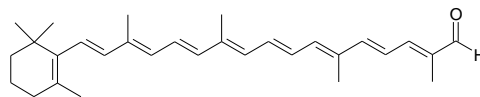
1. 使用機器類

- pHメーター (試液調製の際に用いる)
- 化学天秤
- 加温装置 (ブロックヒーター, 又は恒温水槽など)
- タッチミキサー
- 超音波装置 (超音波洗浄器, 又は超音波水槽など)
- 遠心分離機 (10mL試験管, 3000rpmで使用可能なもの)
- 分光光度計
- 液体クロマトグラフ装置
(紫外可視吸光検出器, カラム恒温槽, グラジエント装置を含むもの)

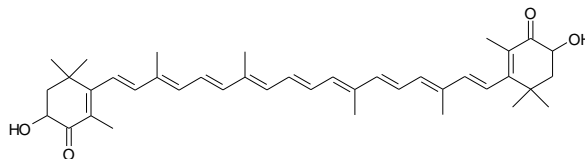
2. 試薬・試液

2-1 試薬

内標準物質 ; trans- β -Apo-8'-carotenal (SIGMA, Cas No. 1107-26-2, ~20 %, suspension (oily))



定量用標準品 ; Astaxanthin (Dr. Ehrenstorfer (代理店: 関東化学), Cas No. CA10307000)



コレステロールエステラーゼ（生化学用，和光純薬工業，037-11221）
2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール（試薬特級，和光純薬工業，207-06275）
精製水
塩酸（試薬特級）
アセトン（試薬特級）
石油エーテル（試薬特級）
メタノール（試薬特級）
セブチルメチルエーテル（試薬一級，和光純薬工業）
リン酸（試薬特級）
硫酸ナトリウム（10水和物，試薬特級）
硫酸ナトリウム（無水，試薬特級）
HPLC カラム，YMC-Carotenoid™ S5μ（4.6×250 mm）
0.45 μm PTFE メンブランフィルター

2-2. 試液の調製

0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) 溶液

2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 3.03 g を 500 mL ビーカーに量り，精製水約 250 mL を加えて溶解する（pH 約 10.3）。これに希塩酸を滴下して pH メーターで pH 7.0 に調整した後，水を加えて 500 mL とする。

コレステロールエステラーゼ溶液 (4 units/mL) …用時調製

コレステロールエステラーゼの必要量を下式により求め，精密に量る。

試験するサンプル数 × 3.0 (mL) × 4 (units/mL) / コレステロールエステラーゼのユニット数 (units/mg)
4 units/mL となるように 0.05 M Tris-HCl (pH 7.0) 溶液で溶かす。コレステロールエステラーゼは秤量後，シールテープを巻いて冷蔵庫で保管する。

内部標準溶液 (I.S.)

trans-β-apo-8'-carotenal 7.5~10 mg を 10 mL 遠沈管に量り，アセトンを加えて 1 mg/mL の溶液とし，7.5 mL を 200 mL メスフラスコに移す。室温で 15 分間放置した後，アセトンでメスアップする。

2-3. 標準溶液の調製

標準試薬 (Astaxanthin) 約 5 mg を 200 mL メスフラスコに精密に量り，約 100 mL のアセトンを加え，10 分間超音波処理をして溶かし室温で 1 時間以上放置する。底に未溶解物が無いことを確認した後，アセトンを加えて正確に 200 mL とし，標準原液とする。

標準原液 3 mL を正確に量り，30 mL メスフラスコに入れ，アセトンを加えメスアップし，標準溶液 A (吸光度測定用，及び逆相 HPLC・純度補正用) とする。

別に標準原液 3 mL と I.S. 10 mL をそれぞれ正確にはかりとって 30 mL メスフラスコに移す。アセトンでメスアップし，これを標準溶液 B (逆相 HPLC 用) とする。

調製後の標準溶液は試験まで遮光して冷蔵保存する。

3. 試験方法

3-1. 試料溶液の調製

試料約 50 mg を 10 mL 遠沈管に精密に量りとり、アセトン 10 mL を加えて溶かし、100 mL メスフラスコに移す。アセトンで数回 10 mL 遠沈管を洗い、洗液は先の 100 mL メスフラスコに加え、室温に 15 分以上置き、アセトンでメスアップする。この液 1 mL を正確に量り、アセトンで正確に 10 mL とする。

この液 3 mL を 10 mL 遠沈管に正確に量り、内標準溶液 1 mL を正確に加えて密栓し、37°C で 2 分間加温した後、コレステロールエステラーゼ溶液 3 mL を加え、5 ~ 10 分おきに静かに振り混ぜながら 37°C で 45 分間反応させる。

※注) 反応液を混和する際は、酵素が失活しないよう、泡立てずに静かに行う。

酵素反応後の溶液に硫酸ナトリウム (10 水和物) 1 g と石油エーテル 2 mL を加えて 30 秒間タッチミキサーで攪拌し、3000 rpm で 3 分間遠心分離する。別の 10 mL 遠沈管に硫酸ナトリウム (無水) 1 g をとり、エーテル層 (上層) を移す。水層 (下層) に石油エーテル 2 mL を加え 30 秒間タッチミキサーで攪拌し、3000 rpm で 3 分間遠心分離する。エーテル層 (上層) を先のエーテル層と合わせる。

集めたエーテル層を窒素気流下で留去し、アセトン 3 mL を加え、超音波をかけて抽出成分を溶かす。

※エーテル層の留去には、35 °C 以下で減圧濃縮を行っても良い。

この液を 0.45 μm のメンブランフィルターでろ過し、試料溶液とする。調製後の試料溶液は試験まで遮光して冷蔵保存する。

3-2. 吸光度測定 (標準溶液のアスタキサンチン濃度測定)

標準溶液 A について、アセトンを対照液として、波長 474nm の吸光度を測定する。

3-3. 液体クロマトグラフ測定

試料溶液、標準溶液 A 及び標準溶液 B について、逆相液体クロマトグラフ法により以下の条件で試験を行い、アスタキサンチン (13-cis, trans, 9-cis の各異性体) 及び内標準物質 (I. S.) のピーク面積を求める。なお、標準溶液 A については得られた液体クロマトグラフ測定の結果からアスタキサンチン標準品の純度補正を行う。

<測定条件>

カラム	: YMC-Carotenoid™ S 5μ (内径 4.6×250 mm)
流量	: 1.0 mL / min
温度	: 25°C 付近の一定温度
検出器	: 紫外可視吸光検出器 (測定波長; 474 nm)
注入量	: 20 μL
分析時間	: 約 30 min
保持時間	: 13-cis Astaxanthin 9 min
	: trans Astaxanthin 10 min
	: 9-cis Astaxanthin 14 min
	: I. S. 16 min

(以上は標準的な保持時間を示したものである。)

<HPLC 分析条件>

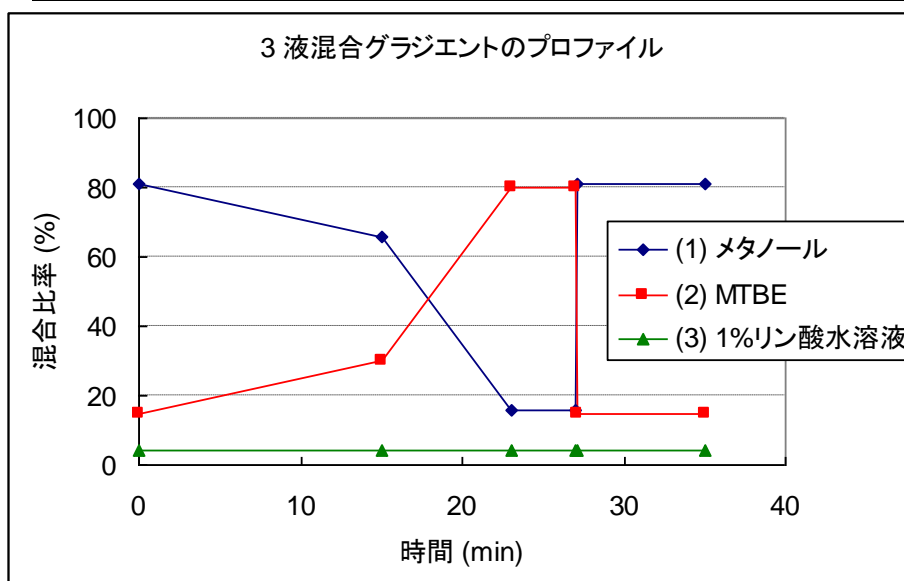
移動相：以下に示す①又は②の条件で混合グラジエント法により試験を行う。

① 3液混合グラジエントの場合

- (1) メタノール
- (2) MTBE ; t-ブチルメチルエーテル
- (3) 1 % リン酸水溶液 ; リン酸 10 mL と精製水 990 mL を混合する。

3液混合グラジエントのプロファイル

時間 (min)	混合比率 (%)		
	(1) メタノール	(2) MTBE	(3) 1%リン酸水溶液
0	81	15	4
15	66	30	4
23	16	80	4
27	16	80	4
27.1	81	15	4
35	81	15	4



② 2液混合グラジエントの場合

(1)液； メタノール・MTBE・1%リン酸水溶液の混合液 (81:15:4)

(2)液； メタノール・MTBE・1%リン酸水溶液の混合液 (16:80:4)

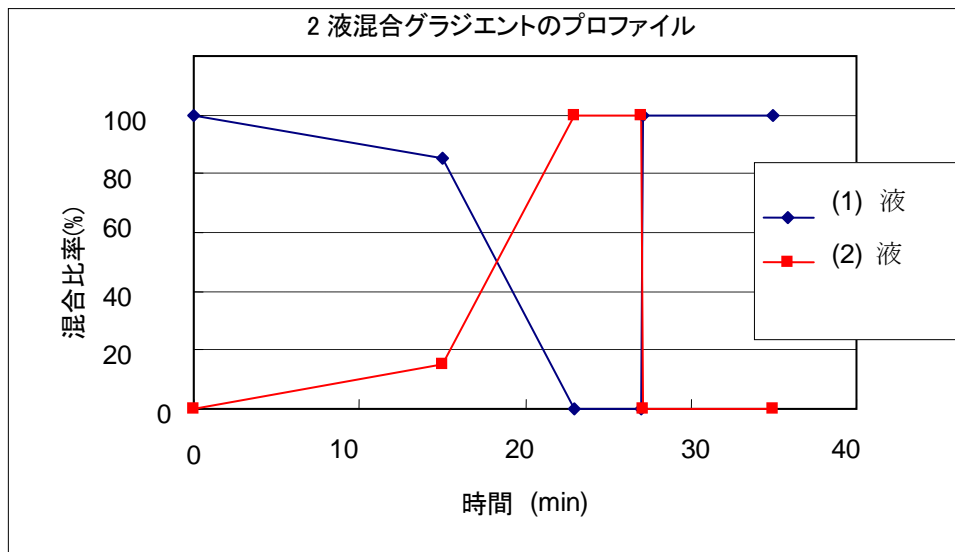
メタノール； 試薬特級 (和光 等)

MTBE； テーブチルメチルエーテル

1%リン酸水溶液； リン酸 10 mL と精製水 990 mL を混合する。

2液混合グラジエントのプロファイル

時間 (min)	混合比率 (%)	
	(1)液	(2)液
0	100	0
15	85	15
23	0	100
27	0	100
27.1	100	0
35	100	0



3-4. 計算方法

標準溶液 A の吸光度, 及び標準溶液 A, 標準溶液 B, 試料溶液の液体クロマトグラフ法による測定結果から, 下式によりアスタキサンチンを算出する.

$$\begin{aligned} & \text{本品中のアスタキサンチンの量 (\%)} \\ & = Q_T / Q_S \times P_S / 100 \times Abs. _S / 210 \times 1000 (\text{mL}) / \text{試料採取量 (mg)} \times 100 \end{aligned}$$

Q_T : 試料溶液のピーク面積比※1

Q_S : 標準溶液 B のピーク面積比※1

P_S : 標準溶液 A のピーク面積百分率※2

$Abs. _S$: 474nm における標準溶液 A の吸光度

210 : 474nm におけるアスタキサンチンの 1 mg/mL アセトン溶液の吸光係数 $\epsilon_{1\text{mg/mL}}$

※1 ピーク面積比 = $(1.3 \times A_{(13\text{-cis})} + A_{(trans)} + 1.1 \times A_{(9\text{-cis})}) / A_{(I.S.)}$
 $A_{(x)}$: アスタキサンチン異性体 (13-cis, trans, 9-cis) 及び
 内部標準物質 (I. S.) のピーク面積

※2 ピーク面積百分率

$$= (A_{(13\text{-cis})} + A_{(trans)} + A_{(9\text{-cis})}) / (A_{(13\text{-cis})} + A_{(trans)} + A_{(9\text{-cis})} + A_{(other)}) \times 100$$

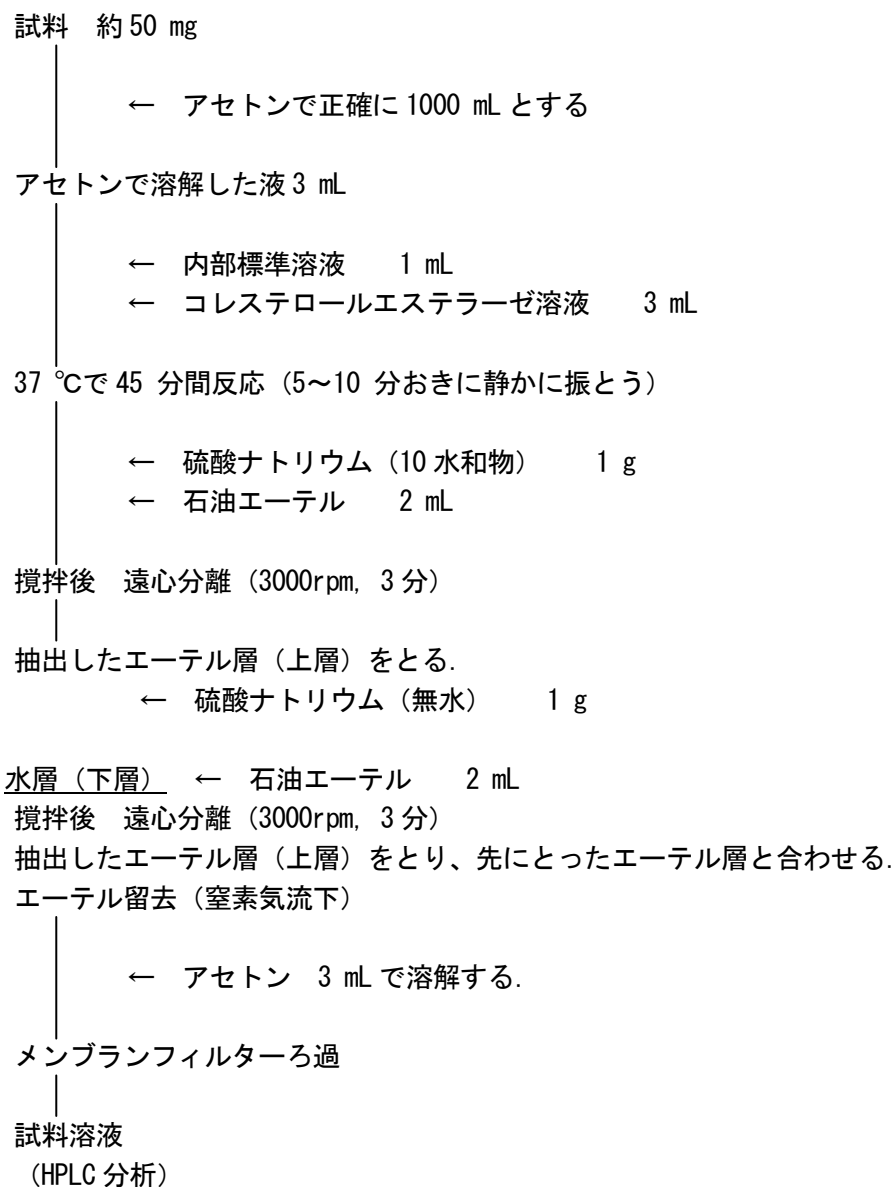
$A_{(x)}$: アスタキサンチン異性体 (13-cis, trans, 9-cis) のピーク面積
 $A_{(other)}$: アスタキサンチン以外の検出された全てのピーク面積の合計

作成 : 富士化学工業株式会社 品質保証部

改定 : 2015 年 4 月 30 日

(参考)

定量法フローシート



<HPLC 分析条件>

カラム: YMC-Carotenoid™ S5 μ (4.6×250 mm)

移動相: メタノール / *t*-ブチルメチルエーテル / 1%リン酸水溶液系のグラジエント

流速: 1.0 mL / min

温度: 25 °C

検出器: UV/VIS, 474 nm

注入量: 20 μ L

標準溶液: Astaxanthin (Dr. Ehrenstorfer 製, Cas No. CA10307000)